

# 水中の微生物による人工有機化合物の分解

川 合 真一郎

## Summary

### Bacterial Degradation of Synthetic Organic Substances

Shin'ichiro Kawai

In order to elucidate the fate and behavior of synthetic organic substances in aquatic environments, the bacterial degradation of PCB congeners and organophosphoric acid triesters were examined by using bacteria isolated from river water and sediment in Osaka City.

*Pseudomonas* sp. from river sediment showed clear growth in basal medium containing 2,5,3'-trichlorobiphenyls. The formation of yellow substances, being the metabolites of PCB, was clearly observed during 10 days of culture. The strain degraded about 30% of mono- and dichlorobiphenyls during 2 days when their concentrations were 1.75 and 1.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. The degradation of KC-300 (Kanechlor-300; The mixture of chlorobiphenyls mainly comprised of trichlorobiphenyls) was also noticed, and the degraded congeners were those containing less than four chlorines judging from the ECD capillary gaschromatograms. Forty-seven strains isolated from river water and sediment degraded about 50% of mono- and dichlorobiphenyls during 5 days of culture, but the degradation rate for trichlorobiphenyls was only 10%.

Organophosphoric acid triesters (OPE) are widely used as flame retardants and plasticizers; some show acute toxicities to fish similar to those of organophosphorus pesticides. TPP (Triphenyl phosphate) was rapidly degraded in less than 5 days while the bacterial degradation of TDCPP (Tris-dichloropropyl phosphate) was not observed at all during 2 months of culture.

A bacterium degrading TBP (Tributyl phosphate) was isolated from the river water in Osaka City after 2 months acclimation to OPE. More than 50% of TBP was degraded by the strain within two hours of incubation when TBP concentration in the inorganic salt medium was 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and the cell density was  $10^8$  CFU/ml. The strain was identified as *Pseudomonas diminuta*. TBP degrading enzyme extracted from the strain showed the highest activity at pH 8.0 and 40°C. This enzyme distributed in the soluble fraction of the cell, and the activity was entirely dependent on NADPH.

This strain was immobilized in Kappa-carrageenan gel beads, and the rate of TBP degradation was studied by the batch and column methods. A hundred of immobilized cell beads were added to 150ml of basal medium containing TBP (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and were incubated at 30°C for several hours. Thirty percent of TBP was degraded only for 30 min. of incubation, and TBP was degraded completely after 4 hours of incubation.

A column (20×300mm) packed with 600 immobilized cell beads was prepared and basal medium containing TBP (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was eluted changing the flow rate. More than 50% of TBP in the medium was removed by the treatment for only 7 min.

## はじめに

人工有機化合物 (Man-made organics または Synthetic organic chemicals) といわれる物質群は今や我々の身の回りに数万種もあるといわれ、とり囲まれているというよりもどっぷりつかっているといっても良いくらいである。これに対し地球誕生以後、自然由来の有機化合物 (Naturally occurring substances) の種類もぼう大である。これら両者の有機化合物を我々人間だけでなく全ての生物が利用しているのである。

前者の人工有機化合物 (各種添加物, 農薬, 医薬, 工業用材料など) の生産量, 使用量は増加の一途を辿っており現代社会がその恩恵をこうむっていることは間違いないが, その一方でこれらの化合物による環境汚染や生物への悪影響が危惧されている。農薬や医薬は元来それらに有する生理活性を利用しているゆえ, 使用方法や用量を誤ると生体に有害であることはうなづけるが工業薬剤 (PCB, 塩化ビニル, 先端産業に必須の有機溶剤) などは生体に本来的には無縁のはずである。にもかかわらず水, 空気, 食物を介して生体に侵入し毒性を発現する。都市部の河川水はもとより, 太平洋全域の海水, 南極の氷の中まで PCB やクロルデン (白アリ防除剤) がみられること, また生物では小さいところでは微細なプランクトンから魚類, 鳥類, 人体, 鯨類まで多種類の人工有機化合物が普遍的に検出されることは多くの人達によって報告されていることである。さらにメチル水銀による水俣病, PCB によるカネミ油症などの悲惨な体験を通じて各種化学物質の毒性スクリーニングが国レベルあるいは OECD (経済協力開発機構) においてとり上げられ十数年経過している。その一連の作業の中で環境中に残留しやすく生体への毒性が明らかなものは我国で特定化学物質に指定され製造, 輸入, 使用について厳しい規制がなされている。現在ではポリ塩化ビフェニル (PCB), ポリ塩化ナフタレン (PCN), ヘキサクロロベンゼン (HCB), アルドリン, ディルドリン, エンドリン, DDT およびクロルデンが該当する。しかし, 現在実用に供されているといわれる 7 万種もの化学物質の環境中での挙動や生体への影響はほとんどわからない。

ところで水環境中に入った有機物はそれが人工のものであろうとなかろうと一般的には水中の微生物の攻撃を受ける。河川は本来的には人間の生活にともなう多種多様な廃棄物が負荷されても自然の浄化力すなわち自浄作用により汚濁物質を分解, 除去する能力を備えているが負荷量が自浄能力を超えたときに水質汚濁の進行という現象になって顕在化する。我国では古来より「水に流す」という言葉がよく用いられてきた。ややこしい人間関係を清算するときの表現として今でも使われる。水に流してしまえばさっぱりするという発想である。汚物についても水に流してしまえば希釈効果と生物分解により問題なしとされたのは明治時代までの話である。今日のように大都市に人口が集中し, 廃棄物の量が飛躍的に増加し, さらに質的にも難分解なものが増加している状況では水に流すという発想は解決にならずむしろ問題が噴出する一方である。

現代の物質文明を謳歌するのは結構なことであるが廃棄物や意図的でないにしても環境を

徐々に侵蝕するような物質の後始末、対策が大巾に遅れていることは現在においても、次世代においても深刻な問題である。

解決策としては生命活動、社会活動にともなう廃棄物量を低減すること、ややこしい物質は極力開発しない、生産しない、使用するとしても用途、用法を限定することが第一である。次に廃棄物の処理技術を向上させることである。これらのことは以前からとり上げられ、とくに昭和30年代以降の我国のみならず諸外国で激しくなった公害問題の中で充分議論されてきたはずである。行政的な対応、処理技術の開発、啓蒙活動等を通じて一定程度の成果が得られ環境問題は沈静化したような昨今であるが根本的なところはさほど前進していない。その理由としてはまず現在の生活様式を変えていくことの難しさ、つまり一度味わった快適さ、便利さを放棄することの難しさであろう。今さら『丸太小屋にろうそく』という生活には誰も見向きもしない。次に自然科学的側面からみたととき各種人工有機化合物の環境中での挙動や運命さらに生物への影響についての情報があまりにも少な過ぎることである。

このようなことを念頭におき筆者らはこの数年間琵琶湖・淀川水系・大阪湾といった一連の水系における人工有機化合物の地点別濃度分布、経年変化、またプランクトンや魚類における蓄積やとりこみに関する野外と室内実験をおこなってきた。

本稿では人工有機化合物の数種について微生物分解性を調べた結果について述べる。

### 1. 水中の微生物による PCB の分解

PCB について述べる前にまず都市河川の代表としての大阪市内河川水中において主要な人工有機化合物の濃度レベルがどのようなかを示す。図1は有機塩素系化合物7種（PCB,  $\alpha$ ~ $\delta$ -HCH, cis-, trans-chlordane）、有機リン系殺虫剤（diazinon, Kitazin-P, fenitrothion）および

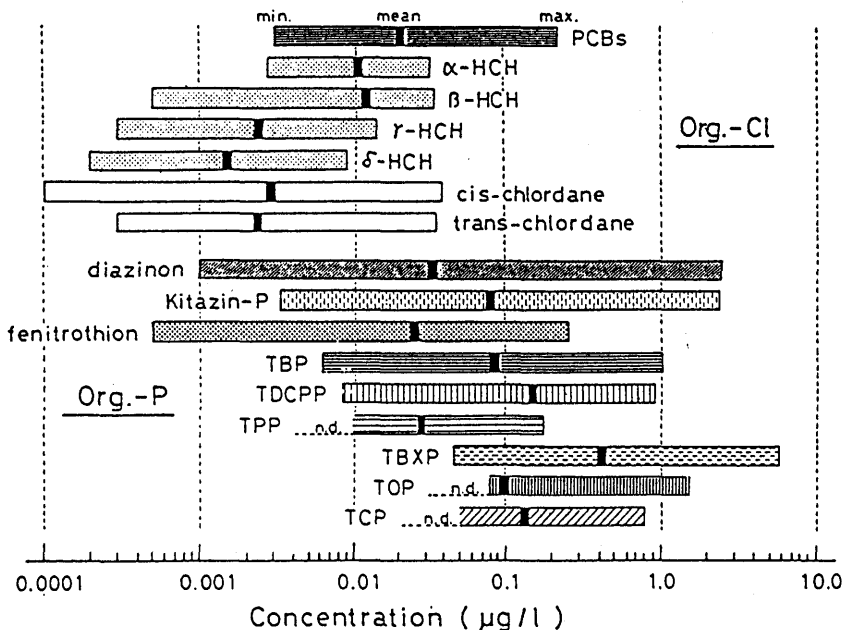
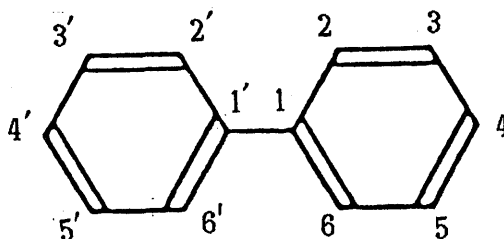


図1 大阪市内河川における有機塩素化合物および有機リン化合物濃度の比較（1984年）

び6種の有機リン酸トリエステル (Organophosphoric acid triesters: OPE) について1984年に26地点で調べた結果である<sup>9)</sup>。PCB (ポリ塩化ビフェニル) や第二次大戦後殺虫剤として多量に使用された HCH (BHC と同一物) は使用禁止もしくは規制されて十数年経過してもまだ環境中で顕著に検出される。また有機リン系化合物の濃度レベルは有機塩素系化合物に比べて明らかに高い。これは DDT や HCH などの有機塩素系殺虫剤の使用禁止にともない有機リン系殺虫剤の使用量が増大したこと、さらに難燃剤、可塑剤として OPE の使用が飛躍的に増加していることにもよる。

PCB は1881年に合成され、商業的生産は米国で1930年に開始された。周知のように PCB は耐熱性、不燃性 (完全な分解には 1000 ~ 1400℃ を要する)、耐薬品性、金属を腐蝕しない、非生分解性、絶縁性などの特徴を有し多方面に用いられてきた。第二次世界大戦後生産は急増しこれと平行して環境汚染が地球規模で広がっていった。PCB は構造的には下図のビフェニルの水素が塩素によって置換されたものであり、塩素置換の位置と数により PCB の同族体は理論的には209種ある。我国ではこれまでに54,000トン生産され、1970年代前半の使用規制措置



ビフェニル

後、回収されたのは7,000トンである。したがって生産されたうちの大半はいろいろな製品中に残っていたりあるいは環境中に拡散しており、PCB 問題は決して終わっていないのである。

PCB, DDT, HCH などは先にも述べたように有機塩素化合物というグループに属するが、この有機塩素化合物を天然すなわち生物がつくり出すことは極めて稀である。微生物が生産する抗生物質などがその例である。塩素は海水の成分として自然界に多量に存在するにもかかわらず有機塩素化合物が生命の誕生以来生合成されなかったのは生物が有機塩素化合物となじまなかったためと考えられている。

しかしこの半世紀の間に人間の生命活動を通じてつくり出された多くの人工有機化合物に対して、水中や土壌中の微生物とくに細菌の中にはこれらの化合物を分解する、あるいは場合によっては人工有機化合物を唯一の栄養源とするようなとてもない能力を持つものが出てきた。そのような例について以下に述べる。今回の実験<sup>9)</sup>に用いた PCB の同族体は図2に示したように1~4 塩素化物である。そのほか KC-300 (カネクロル 300: 3 塩素化物を主体とした PCB の混合物) も用いた。

#### 1-1 PCB分解菌の性質

大阪市内の河川および港湾域の水や底泥から分離した菌の一般的性状を調べた中で数種の抗

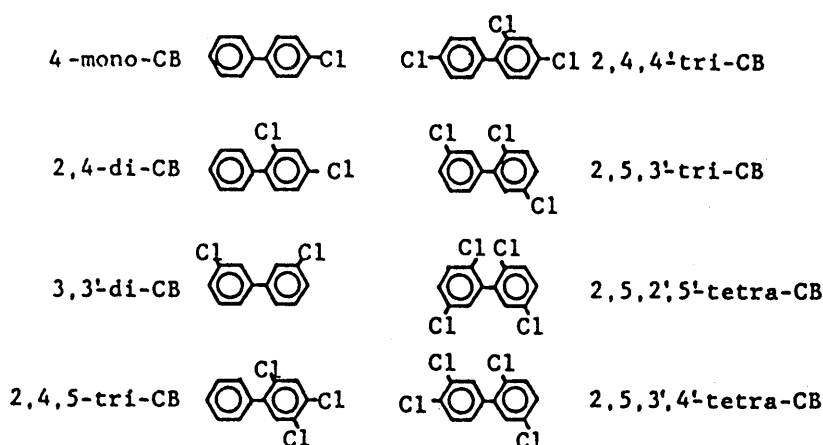


図2 実験に用いた PCB 同族体

生物質に対して高度耐性を保持しかつ多剤耐性を示す菌（仮に 3S-3 と称す）を選び PCB 分解性の検討に供した。この菌はペニシリン-G, アンピリシンに高度な耐性を示したクロラムフェニコルやエリスロマイシンに耐性を示す 4 剤耐性菌であった。同定したところ *Pseudomonas* sp. であることがわかった。Pseudomonas 属細菌はグラム陰性菌の中でも薬剤耐性を示すものが多いといわれており自然界では土壌、水に広く分布している。環境科学の面からいえば有機物の無機化に Pseudomonas 属はきわめて大きな役割を果しており、いわゆる難分解性物質を含めた有機化合物資化能の広さは抜きんでていることが知られている。

2, 5, 3'-トリクロロビフェニルを 10 ppm の濃度で含む基本培地に上述の 3S-3 菌を加えて培養すると徐々に増殖がみられ 12 日間の培養で 600 nm における吸光度が 1.0 にまで達した。細菌による PCB の分解において代謝産物が黄色を呈することはよく知られており、さらにこの代謝産物が 400 nm 付近で吸収極大を示すことがわかっている。本実験においても菌の増殖が顕著にみられた培養 5 日目から培養液は黄色を呈し始めた。そのときの吸収スペクトルは図 3 に示したとおりである。5 日目では 400 nm 付近に小さなピークが認められ、8 日目では最も顕著なピークがみられた。しかしさらに培養を続けるとこのピークの吸収極大は低波長側にシフトするようであり、おそらく代謝分解がさらに進行したためと考えられる。PCB の同族体あるいは異性体のうちいずれの化合物の分解の際に黄色を呈しやすいかについても報告されている。たとえば PCB 2 塩素化物 10 種および 3 塩素化物 9 種について *Alcaligenes* sp. による分解性と黄色物質の生成量が矢木ら<sup>3)</sup>により調べられているが、10 ppm と 100 ppm の濃度になるように PCB を加えて 24 時間培養すると 2 あるいは 5 の位置に塩素が付加したものから黄色物質が多量に生成されることが明らかにされている。

このような結果をもとに以下 PCB のいろいろな同族体を用いて 3S-3 株による分解性を検討した。

#### 1-2 KC-300の微生物分解

3 塩素化物を主体とした PCB の混合物である KC-300 の 3S-3 による分解率は初期濃度が

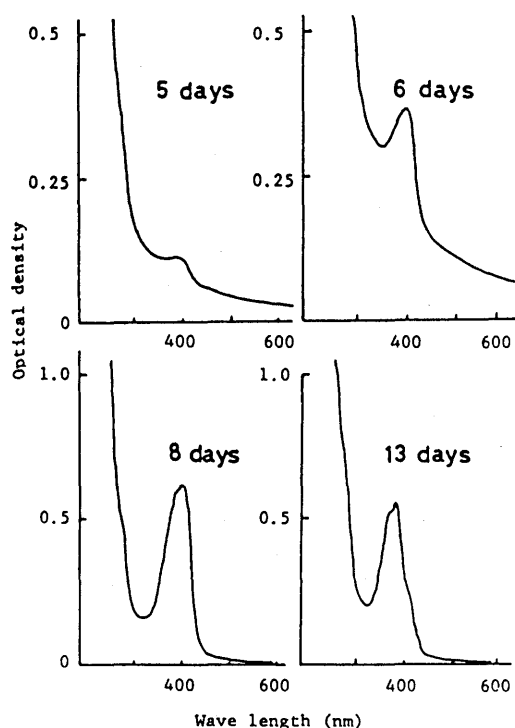


図3 培養液の吸収スペクトル

4.2 ppm のとき 2 日間で 4.5%, 5 日間で 12.8%, 15 日間で 14% であったが初期濃度が 0.8 ppm のときは 4 日間で 62% が分解された。このときのガスクロマトグラムを示すと図 4 のとおりである。分析条件は脚注に記したがこの条件下では KC-300 の標準液は 10 本のピークが認められ No. 2 ~ 6 の分解が顕著であった。

難分解性物質の微生物分解を調べる上で手法上の問題点の一つは化合物の揮散性である。本実験では熱処理 (100℃, 10 分) した死菌を対照として用い, 図 4 の中央に示した。No. 1 ~ 3

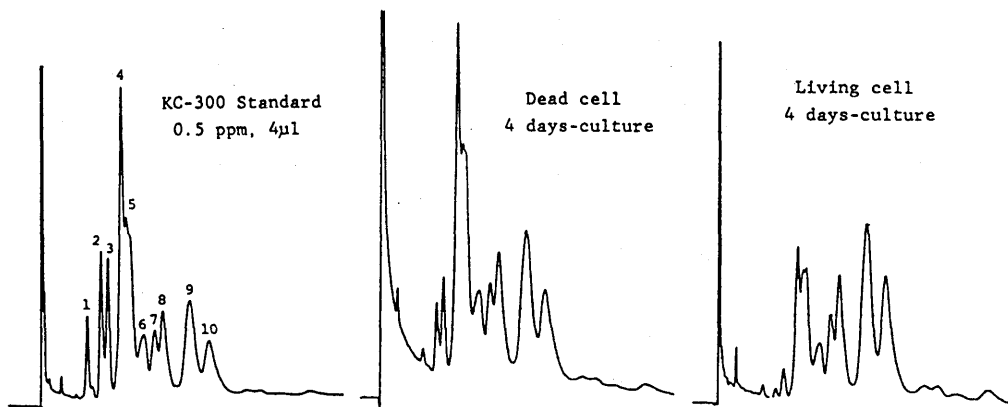


図4 KC-300を含む培地で5日間培養後のECD ガスクロマトグラム

Conditions; Column 25 silicone OV-1 on Gaschrom Q 80/100 mesh, 3mm i.d.×2m;  
Column Temp. 195℃; Detector Temp. 250℃; Carrier Gas, N<sub>2</sub> 35 ml/min.

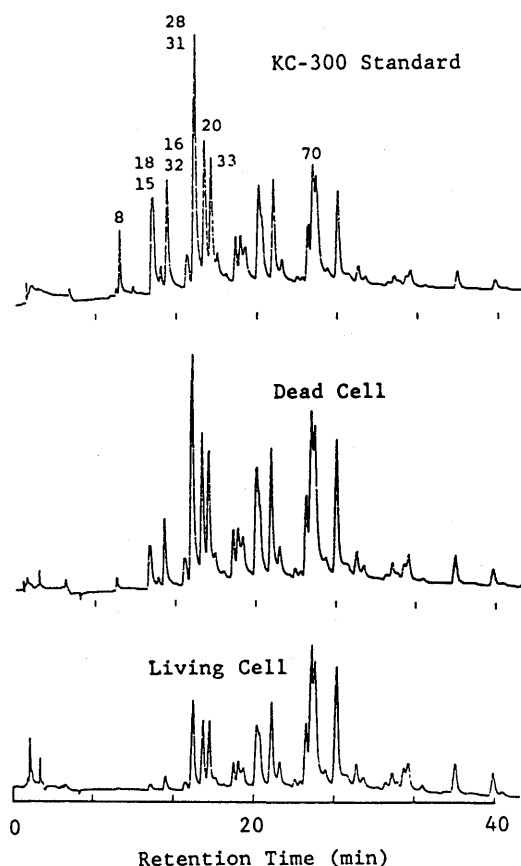


図5 KC-300を含む培地で5日間培養後のECDキャピラリーガスクロマトグラム

Conditions; 25m×0.32mm i.d. fused silica column, 0.52 $\mu$ m film of Methyl Silicone; N<sub>2</sub> carrier gas at 5ml/min; N<sub>2</sub> make up gas at 50ml/min; Column oven temp. at 160°C for 4min, then 1°C/min to 220°C.

のピークでは揮散が認められたがそれ以外では影響はないようである。分解が認められたピークの中にはPCBの同族体が複数含まれているため、いかなる構造のものが分解されやすいかどうかの情報は得られない。したがって同じ試料についてキャピラリーガスクロマトグラフィにより詳細に検討した(図5)。KC-300標準液には今回の分析条件下で約40本のピークがみられるが図5中の主要なピークをBallschmiderら<sup>4)</sup>のナンバリングにしたがって構造と分解性をみるとNo.8(2,4'-ジクロロビフェニル、以下同様の記述)、No.18と15(2,2',5と4,4'), No.16と32(2,2',3と2,4',6)、No.28と31(2,4,4'と2,4',5)、No.20(2,3,3'), No.33(2',3,4)など2~3塩素化物の示すピークが対照(熱処理した菌)と比較して低くなり本菌による分解が明らかであった。一方、図5中の保持時間が20分を超えるピークについてNo.70(2,3',4',5-テトラクロロビフェニル)を基準にして各ピークの相対的高さを比較するといずれのピークもほとんど低下せず、分解が生起していないことがわかる。Furukawaら<sup>5)</sup>はAlcaligenesと



Acinetobacter を用いて PCB31種の生分解性を調べているが塩素置換数が増すにつれて生分解性は減少し4塩素化物以上での分解はほとんどみられなくなることを報告しており、上述の結果もほぼ類似の傾向を示している。

### 1-3 大阪市内の河川から分離した細菌によるPCBの分解

大阪市内の河川や底泥からランダムに分離した計47株の細菌について4-CB（モノクロロビフェニル，5 ppm），2,4-DCB（ジクロロビフェニル，1.0 ppm），2,4,5-TCB（トリクロロビフェニル，1.0 ppm），および2,4,4'-TCB（トリクロロビフェニル，1.0 ppm）の分解性を検討し結果を図6に示した。5日間の培養により4-CBや2,4-DCBは約50%が分解されたが3塩素化物の2,4,5-TCBや2,4,4'-TCBは約10%程度の分解がみられたに過ぎなかった。これらの結果からすると都市河川で通常みられる菌はPCBのうち低塩素化物ならばある程度の分解能を有しているといえよう。同様の結果が米国ミシガン州の河川水についても得られており4塩素化物の2,2',4,4'-テトラクロロビフェニルは98日間の培養でも全く分解されなかったという<sup>6)</sup>。

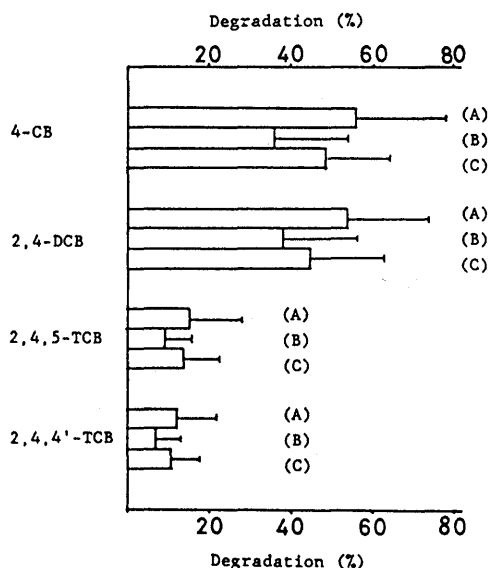


図6 河川水および底泥中の細菌によるPCB同族体の分解

(A) Senbonmatsuwatashi Sediment (n=17)  
 (B) Mutsumibashi Sediment (n=16)  
 (C) Daikokubashi Water (n=14)

このような微生物による人工有機化合物の分解が水界における人工有機化合物の挙動や運命にあるいは分解，無毒化にどの程度貢献しているかを把握することは困難であるが何らかの役割を果たしていると期待したいところである。

PCB等の難分解性物質を唯一の炭素源として生育する菌の育種に成功した例はいくつか挙げることができるが最近ではベトナム戦争において枯葉作戦と称し大量に使用された除草剤の2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,5-T)を唯一の炭素源として生育し，土壤中に2,4,5-T

が1%以上含まれていても6週間で90%以上分解し、除草剤としての生理活性を消失せしめるという菌 (*Pseudomonas cepacia*) の育種に成功した例<sup>7)</sup>は興味深かつ意義も大きいと考えられる。しかし通常環境では特定の汚染物質が高濃度に蓄積、分布していることはむしろ稀であり、易分解性から難分解性までの多種多様な物質が存在していると考えられ、このような状況においてそこに生息している微生物がどのような挙動を示すかは最も興味深い。

以上 PCB の微生物分解について述べたが PCB を含めた各種有機塩素化合物が環境中での残留性や生物に対する毒性のゆえに使用禁止や規制されるようになって以後相対的に生分解を受けやすい有機リン系化合物の使用量は急激に増加している。この傾向は農業や工業薬剤でとくに顕著である。

このうちの有機リン酸トリエステルについて以下に述べる。

## 2. 有機リン酸トリエステルの微生物分解

有機リン酸トリエステル類 (OPE) はプラスチックの可塑剤や繊維製品の難燃加工剤として我々の身の回りの工業製品に、また工場では抽出溶剤や重合触媒、潤滑油添加剤として多目的に使用されている。現在用いられている OPE の種類は非常に多いがそのうちのいくつかについては魚毒性や蓄積性も調べられている。たとえばメダカにおける96時間 LC<sub>50</sub> (Lethal Concentration 半数致死濃度) は TPP で 1.2 ppm, TDCPP 5.1 ppm, TBP 8.8 ppm であり有機リン系殺虫剤のマラチオン、ジメトエート、ジクロロフォス、サリチオンと同程度の毒性を示すという。さらに体重 0.1~0.2 g のメダカにおける脊椎骨異常については TPP 1.1 ppm に72時間暴露すると40%が、また TDCPP では 3.5 ppm, 24時間の暴露で70%に奇形の発生が認められたと報告されている<sup>8)</sup>。さらに TPP はニジマスに蓄積されること<sup>9)</sup>や TDCPP に変異原性があること<sup>10)</sup>も知られており水環境においては水生生物等への影響が危惧される物質群である。水中の細菌による OPE の分解については未だ報告例が少ない。

### 2-1 River die-away法によるOPEの微生物分解<sup>11,12)</sup>

供試した OPE の化学式と用途は表1に示したとおりである。アルキル系エステルの TBP, TBXP, TOP, アリル系エステルの TPP, 含ハロゲン系エステルの TDCPP 計5種である。今回用いた river die-away test と称される方法は供試化合物を河川水に加えて室温でゆっくりかくはんし、経時的に供試化合物の濃度を測定することから分解速度を求めるものである。大阪市内河川における OPE の一般的な濃度は前掲の図1に示したが 0.01~1.0 µg/l の範囲内にあり濃度の序例は TBXP>TDCPP>TBP>TOP>TPP である。

1986年1月に大阪市内の3地点で河川水を採取し水中細菌による OPE の生分解性を調べた結果を図7に示した。いずれの地点においても TPP の分解が最も顕著であり、TPP は培養開始後2~5日は変化しないか、もしくは漸減の状態を保ったのち急激に減少する経過を辿った。95%以上が分解するのに要した日数は地点によって異なるが徳栄橋で4日、戎橋で5日、毛馬橋で6日であった。一方、TDCPP は3地点のいずれにおいてもまったく分解が認められず水環境での安定性が非常に高いことが明らかであった。TBP, TBXP および TOP の分解の

表1 実験に用いた有機リン酸トリエステル類の構造と用途

TBP $(C_4H_9O)_3P=O$	Tributyl Phosphate plasticizer for cellulose and chlorinated rubbers, antifoaming agent, metal extractant.
TDCPP $(\begin{smallmatrix} CH_2Cl \\   \\ CH_2Cl \end{smallmatrix} CHO)_3P=O$	Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate additive type flame retardant for PVC, polyurethane foam and other plastics
TBXP $(C_4H_7OC_2H_5O)_3P=O$	Tris (butoxyethyl) phosphate low-temperature flexible plasticizer for cellulose acetate and PVAc, leveling agent of waxes.
TPP $(C_6H_5O)_3P=O$	Triphenyl phosphate flame retardant for PVC, cellulose, synthetic rubbers, phenolics and TPO-resin
TOP $(C_8H_{17}O)_3P=O$	Tris (2-ethylhexyl) phosphate plasticizer for PVC wall paper and film for agricultural use.

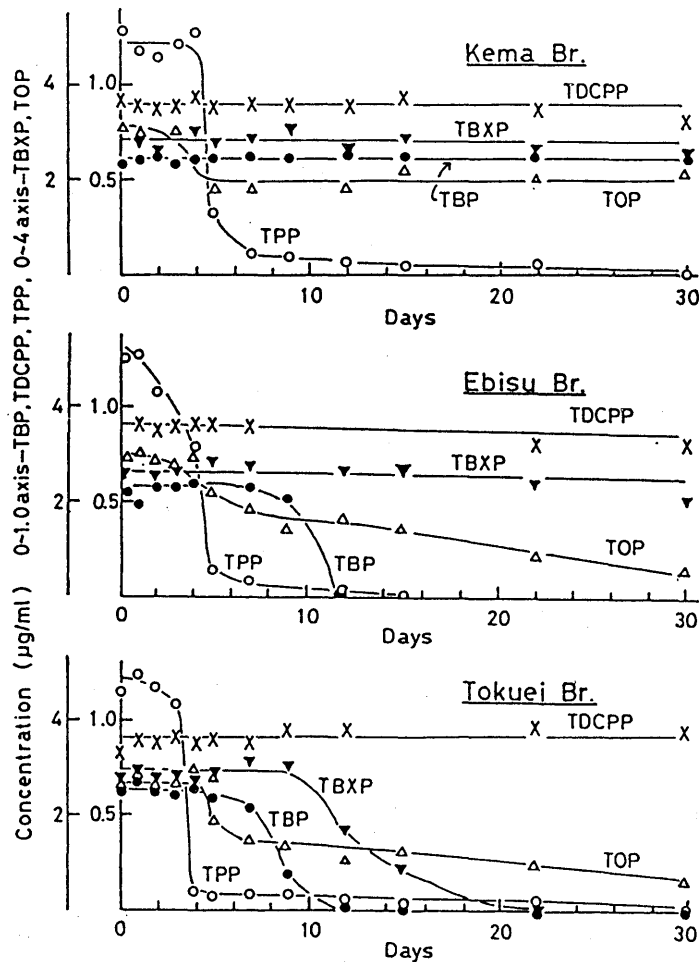


図7 河川水中のバクテリアによる有機リン酸トリエステル類の生分解

様相も地点間の差が明らかであった。OPE の分解性は徳栄橋>戎橋>毛馬橋という序列になり河川の汚濁レベルを直接反映していた。有機汚濁レベルの高い地点では OPE の分解活性の高い細菌が優占していると考えられる。

これまでに起こった 3 回の実験で得られた結果をもとに河川水における OPE の半減期を算出すると表 2 のようである。TDCPP のみはこれまで調べた限りにおいて細菌による分解が

表 2 有機リン酸トリエステル類の河川水中における半減期

Chemicals	Experiment			Average
	I	II	III	
TPP	3	4	3	3
TOP	6	16	4	9
TBP	7	9	35	17
TBXP	12	71	28	37
TDCPP	—	—	—	—

(Days)

認められなかったため半減期は求め得なかった。水系における OPE の半減期についてはいくつかの知見が得られており<sup>13,14)</sup>、共通していえることは TPP のようなアリル系エステルの半減期が 2～7 日であることと TDCPP は分解されないことであり、筆者らの結果と同様である。

## 2-2 馴養株の TBP 分解性と諸性状<sup>11)</sup>

上述の徳栄橋河川水に 5 種の OPE を加えて 2 ヶ月間以上培養していると TBP (トリブチルフォスフェイト) を強力に分解する菌株が単離し得た。(同定した結果 *Pseudomonas diminuta* であったがここでは便宜的に No. 4 株と称す。) この菌株について以後詳細に検討した。No. 4 株を乾燥ブイヨン培地を用い 30℃ で 2 日間培養後集菌し、TBP を 0.6 μg/ml の濃度で含む基本培地に植菌した。TBP 分解の経時変化を示すと図 8 のとおりである。2.5 時間で 30%、9.5 時

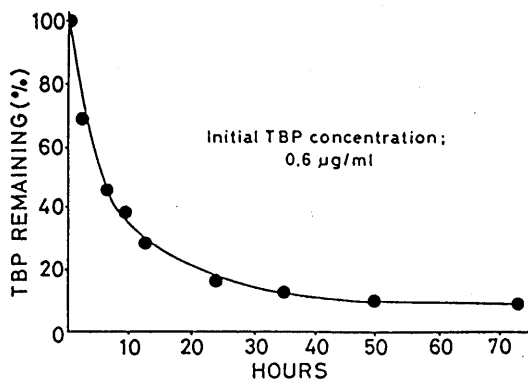


図 8 No.4株による TBP の迅速な分解

間で 60%、24 時間後には 83% が分解された。通常の河川水における TBP の生物学的半減期は先にも述べたように 17 日であることからすると No. 4 株の分解活性が極めて高いことがわかる。

TBP の分解率には植種する菌数も大きく影響すると考えられ、菌濃度と TBP 分解との関係を調べ図 9 に示した。TBP の初期濃度を  $2\mu\text{g/ml}$  に設定したとき  $10^6\text{ CFU/ml}$  では 2 時間後に

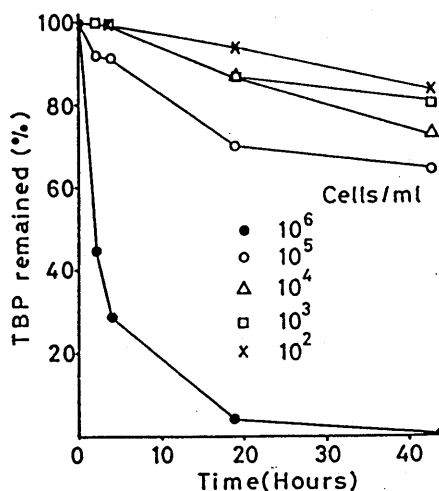


図 9 TBP 分解におよぼす菌濃度の影響

55%, 4 時間で 70%, 19 時間で 97% が分解され 43 時間後には培地中から完全に消失した。 $10^5\text{ CFU/ml}$  では  $10^6\text{ CFU/ml}$  に比して分解は遅く 43 時間後でも 36% が分解するにとどまった。このように TBP 分解は菌濃度に大きく左右されることが明らかであった。

### 2-3 No.4株が有するTBP分解酵素に関する検討<sup>11)</sup>

乾燥ブイヨン培地で No. 4 株を培養後集菌し、フレンチプレスにより細胞破碎したのち  $10,000 \times g$ , 30 min の遠心上清を粗酵素液とした。これを用いて TBP 分解酵素の最適作用条件を調べた結果 pH 8.0 および  $40^\circ\text{C}$  付近で最も高い活性が認められた。

また、TBP 分解酵素の細胞内分布を検討するために常法により各画分を調製した。結果は図 10 に示した。ホモジネートにおける全活性を 100 としたときの各画分における活性を比較する

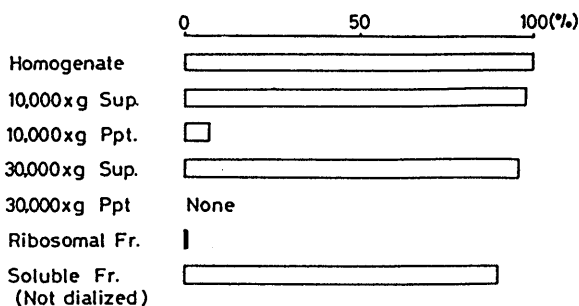


図10 TBP 分解酵素の細胞内分布

と  $10,000 \times g$  の遠心上清が 98%,  $30,000 \times g$  上清画分 (S-30 と通常称され、ここにはリボゾーム, t-RNA, DNA, 各種酵素が含まれる) には 96% が存在し、その沈殿画分には活性が全く認められなかった。 $105,000 \times g$  の遠心沈殿画分 (リボゾーム画分) には痕跡程度の活性がみら

れたにすぎず、一方その上清すなわち S-100 と呼ばれる可溶性画分にはホモジネートの 90% の活性が分布しており、TBP 分解酵素の細胞内分布は可溶性画分にあると結論し得る。105,000 × g の上清画分を一夜、標準緩衝液で透析すると活性は完全に消失するが透析した S-100 画分に 1 μmol の NADPH を添加して酵素反応をおこなうと活性は 100% 回復した。このことから No. 4 株の TBP 分解酵素は NADPH 依存性であり MFO (Mixed Function Oxidase) の関与が示唆された。

## 2-4 No.4株のバイオリアクターとしての応用

近年、排水処理や環境浄化へのバイオテクノロジーの応用という分野において注目されているのがバイオリアクターであり、その基本原理は有用菌や酵素を適当な担体に固定化することによって汚濁物質を効率よくまた連続的に分解しようとするものである。

食品工業や医学、薬学分野でも有用物質の生産において非常に脚光を浴びている技術である。固定化法には担体結合法、架橋法、包括法などがあるが環境科学分野では微生物菌体の包括固定化法が比較的良好に研究されている。この包括固定化は連続使用が可能であり、菌体密度を高めることにより汚濁物質の処理効率を上げることができ、さらに固定化菌体は外環境、たとえば pH や温度などの影響を受けにくく、雑菌混入による活性低下を起こしにくいという利点がある。

上述の TBP 分解菌を κ-カラギーナン（紅藻類から単離される多糖類）に包括固定化しバッチ法とカラム法によって TBP の分解がどうかを調べた。

Tosa らの方法<sup>15)</sup>を参考にし調製した固定化菌体ビーズ（直径約 4.5 mm）100個をフラスコに入れ TBP を 1.8 μg/ml となるように添加し 30°C で培養した（バッチ法）。培養液を経時的にとり残存する TBP をガスクロマトグラフィにより定量し結果を図11に示した。培養30分で加

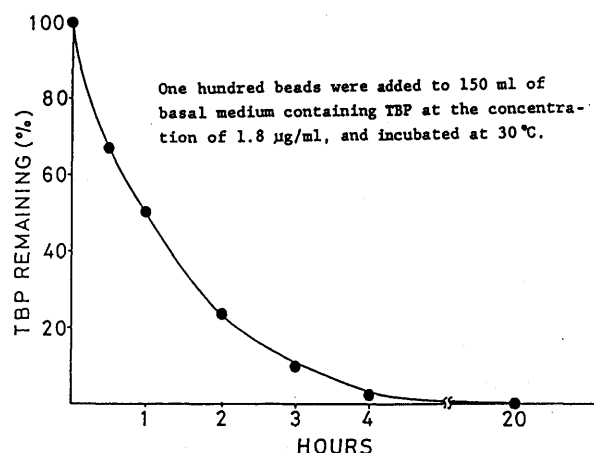


図11 固定化菌体による TBP の迅速な分解

えた TBP の 32% は消失し 4 時間で 98% が、また 20 時間後には培養液中からは全く検出されなかった。非固定化菌体すなわち通常の液体培養（図 9）におけるよりもさらに効率よく分解されることがわかる。

固定化菌体を用いて特定の物質を分解しようとする際ビーズをカラムに充てんして用いる方が操作も容易と考えられる。内径 20 mm、長さ 30 cm のカラムに固定化菌体ビーズを600個充てんし TBP を  $2\mu\text{g/ml}$  の濃度で含む基本培地を流した。流出速度すなわち処理時間をいろいろと変えたときの TBP 分解率を求め図12に示した。TBP を含む基本培地のカラム内滞留時間

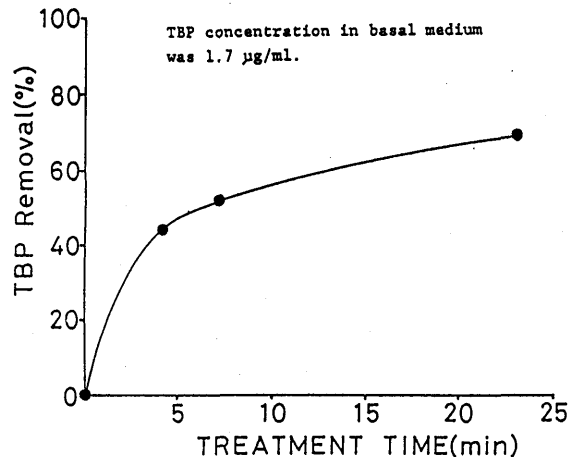


図12 カラム法による固定化菌体の TBP 分解

(処理時間) が 4 分、7 分および 23 分のとき TBP の除去率はそれぞれ 44%、52% および 69% であった。処理時間が 10 分以内でも 50% 以上が除去され、上述のバッチ法よりもさらに効率が良いことが明らかであった。

固定化菌体を用いての汚染物質の分解を実用化するには未解決のことながらも多い。多種多様な有機物が共存するとき目的とする化学物質を選択的に分解するかどうか、温度の問題、固定化菌体ビーズの強度の問題などである。

## おわりに

難分解性物質の代表選手ともいわれる PCB についてまた電気製品、繊維製品、プラスチック製品等に使用されている有機リン酸トリエステル類について微生物分解性を述べてきた。とくに有機塩素化合物は環境中での強い残留性やヒトも含めた生物への毒性が明らかとなるにつれて生産の中止や使用規制措置がとられている。しかし東南アジア、南米、アフリカなどの発展途上国においては病虫害の駆除のため有機塩素系殺虫剤が今もなお、使用されている。マラリア防除のために DDT が使用されていることなどはその典型である。マラリアによる死亡を低減させるか、DDT による毒性を甘んじて受けるかのいずれを選択するかは非常に難しい問題である。そしてこのような例は我々の身の回りにあまりにも多い。病虫害駆除のためならまだしも、快適さの追求のため、豊かな生活のためという名目のもとに使用されている化学物質で生体に有害なものが何と多いか。

いったん環境中に出た人工有機化合物のあるものは微生物の有する分解、代謝能により無毒

化される場合もあるが天然の有機化合物に比べると問題にならない程分解能、自浄能力は低いと考える方が妥当である。したがってはじめにも述べたように環境中に拡散しないよう努力すること、微生物の有する自浄能力を発揮しやすい状況をつくり出すこと、さらに微生物の機能を処理技術の中にとり入れることなどが当面の大きな課題といえよう。そして強烈なしっぺ返しを何とかくい止めるあるいは最少限におさえる方策を探ることが我々のつとめと考えている。

#### 引用文献

- 1) 福島実, 川合真一郎: 生態化学, **8** (4), 13-24 (1986)
- 2) 川合真一郎, 北野雅昭, 江川文雄, 森下日出旗: 阪市環科研報告, 第47集, 124-130 (1985)
- 3) 矢木修身, 松重一夫, 須藤隆一: 用水と廃水, **26**, 3-12 (1984)
- 4) Ballschmiter, K. and M. Zell: *Fresenius Z Anal. Chem.*, **302**, 20-31 (1980)
- 5) Furukawa, K. and A. M. Chakrabarty: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 619-626 (1982)
- 6) Balley, R. E., Gonslor, S. J. and W. L. Rhinehart: *Environ. Sci. Tech.*, **17**, 617-621 (1983)
- 7) Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K. and A. M. Chakrabarty: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1697-1700 (1983)
- 8) Sasaki, K., Takeda, K., and Uchiyama, M.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 775-782 (1981)
- 9) Lombardo, P. and Egry, I. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 47-51 (1979)
- 10) Gold, M. D., Blum, A. and Ames, B. N.: *Science*, **200**, 785-787 (1978)
- 11) 川合真一郎, 福島実, 北野雅昭, 森下日出旗: 阪市環科研報告, 第48集, 175-183 (1986)
- 12) 川合真一郎: 環境技術, **16** (2), 138-145 (1987)
- 13) Saeger, V. W., Hicks, O. and Tucker, E. S.: *Environ. Sci. Tech.*, **13**, 840-844 (1979)
- 14) 服部幸和, 石谷寿, 久下芳生, 中本雅雄: 水質汚濁研究, **4**, 137-141 (1981)
- 15) Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yomamoto, K., Takata, I., Nishida, Y., and Chibata, I.: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1697-1709 (1979)

原稿受理1988年9月19日